



TITLE:

小胞体ストレス応答に基づいた抗
精神病薬オランザピン惹起型糖尿
病発症機構の解析(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

小篠, 里和

CITATION:

小篠, 里和. 小胞体ストレス応答に基づいた抗精神病薬オランザピン惹起型糖尿病発症機構の解析. 京都大学, 2020, 博士(理学)

ISSUE DATE:

2020-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.r13322>

RIGHT:

京都大学	博 士（理 学）	氏名	小篠 里和
論文題目	小胞体ストレス応答に基づいた抗精神病薬オランザピン 惹起型糖尿病発症機構の解析		
(論文内容の要旨)			
<p>オランザピンという抗精神病薬では他の抗精神病薬と比べて副作用である糖尿病の発症確率が有意に高いことが知られている。血中グルコース濃度、いわゆる血糖値はインスリン等複数のホルモンの働きによってその恒常性が維持されている。なかでもインスリンは肝臓や脂肪細胞などによる血糖の取り込みをコントロールすることによって、血糖値の恒常性に大きく寄与している。例えば、インスリンの分泌不全などによって血糖値の恒常性が乱れると、血糖値が通常よりも極めて高くなる糖尿病の症状が認められるようになる。糖尿病は主に肥満や、それによって引き起こされる肝臓や脂肪細胞等がインスリンに反応しにくくなるインスリン抵抗性という症状を伴う2型糖尿病と、肥満やインスリン抵抗性は伴わない1型糖尿病に大別される。オランザピンを投与された患者の多くが、2型糖尿病を発症することに対する知見は過去に多数知られていたが、オランザピン投与による糖尿病患者の一部においては、2型糖尿病に見られる肥満やインスリン抵抗性が観察できない1型糖尿病様の病態を示すことが近年知られてきた。インスリンは、すい臓ランゲルハルス島に存在する分泌細胞の一つであるすい臓β細胞によって大量に合成・分泌される。そのため、すい臓β細胞では非常に小胞体が発達しており、またタンパク質合成によって生じるストレスに対して感受性が高いことが知られている。本研究では、オランザピンが小胞体にもたらすストレス(小胞体ストレス)および小胞体ストレスによって誘起されるシグナル伝達機構(小胞体ストレス応答)に及ぼす影響を明らかにすることによって、インスリン合成分泌能低下のメカニズムについて詳細な解析を行ない、オランザピンの副作用である1型様糖尿病の発症機構を解明しようと試みた。実験には Syrian golden hamster すい臓β細胞株HIT-T15を用いた。通常、哺乳類細胞はインスリン遺伝子を二つ有するが、ハムスター細胞は一つのインスリン遺伝子しか有さないため、後述するノックダウン実験を容易に行うことができるという長所を持つ。なお、ネガティブコントロールとしては、リスペリドンという糖尿病の副作用を比較的引き起こしにくい抗精神病薬を用いた。</p> <p>オランザピンがHIT-T15細胞に与える影響について解析した結果、オランザピンはすい臓β細胞特異的にアポトーシスを惹起することが判った。オランザピンは小胞体ストレスに脆弱であることから、このオランザピンによるアポトーシスには小胞体ストレスが関与しているのではないかと考えた。小胞体ストレス応答の経路であるATF6経路、IRE1経路について検証を行ったところ、オランザピンはすい臓β細胞に弱い小胞体ストレスを引き起こすことがわかった。そ</p>			

ここでさらに、小胞体ストレス応答のもう一つの伝達経路であるPERK経路について解析を行った。PERKはeIF2の α サブユニット(eIF2 α)をリン酸化することにより細胞全体におけるタンパク質の翻訳抑制を引き起こし、さらに逆説的に、翻訳抑制に伴ってATF4やCHOPが誘導される。解析の結果、オランザピンはPERK経路のセンサータンパク質PERKの活性化を正常に惹起するが、eIF2 α のリン酸化をはじめとするPERK経路下流におけるシグナル伝達を抑制することがわかった。ところで、eIF2 α のリン酸化はアミノ酸飢餓によりGCN2依存的(PERK非依存的)に引き起こされることも知られている。このGCN2によるeIF2 α のリン酸化は、オランザピンにより弱まることはなかった。よってオランザピンは小胞体ストレス応答(PERK経路)に依存するeIF2 α のリン酸化にのみに影響を与えることがわかった。

グルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)は二量体となる性質をもつことから、GSTと融合させたPERKの細胞質側領域はPERKの強い活性化状態を模倣した状態となることが知られている。GSTのカルボキシル基末端をマウス由来のPERKの細胞質側領域に融合させたGST-PERK融合タンパク質とeIF2 α とをオランザピン存在下・非存在下で反応させることで、オランザピンがPERKのeIF2 α に対するキナーゼ活性を抑制するかどうかをin vitroにおいて調べたが、オランザピン存在下においてもGST-PERKによるeIF2 α のリン酸化の抑制は確認できなかった。さらに細胞内において小胞体ストレスインデューサーであるツニカマイシンにより引き起こされるeIF2 α のリン酸化に、オランザピンが影響する可能性について検討するため、オランザピンでの前処理後、ツニカマイシンで種々の時間処理を行ないツニカマイシンによるeIF2 α のリン酸化が起きているかどうかを観察した。その結果、オランザピンによる前処理によりツニカマイシンの添加によって誘導されるeIF2 α のリン酸化が有意に抑制された。このことはオランザピンによる弱い小胞体ストレスが引き起こすはずのeIF2 α のリン酸化がオランザピン処理により抑制され得ることを示唆している。このツニカマイシンによるeIF2 α のリン酸化の抑制は、オランザピンとツニカマイシンとをHIT-T15細胞に同時に処理することによっても観察された。

次いで、オランザピン処理細胞ではPERK経路活性化に基づくタンパク質の翻訳抑制が正常に惹起されないことを放射線標識により明らかにした。リスペリドン処理を行なった細胞では翻訳抑制が観察された一方、オランザピン処理を行った細胞では未処理細胞と同様に翻訳抑制が起きている様子は観察できず、タンパク質の合成が通常通り行なわれていることがわかった。また、タンパク質の翻訳を阻害する薬剤であるシクロヘキシミドで処理することにより、オランザピンによって引き起こされる小胞体ストレスおよびアポトーシスが抑制されることがわかり、このことはPERK経路によるタンパク質翻訳抑制が、オランザピンによる小胞体ストレスおよびアポトーシスに関与しているものと推測された。

上述したように、すい臓 β 細胞内ではインスリンが大量に合成・分泌される。そのためインスリンについて検証を行ったところ、オランザピン処理を行なったHIT-T15細胞内では、インスリンの分泌阻害ならびに細胞内におけるインスリンおよびその前駆体であるプロインスリンの蓄積

が認められた。また、上述した通りHIT-T15細胞はインスリンの遺伝子を持つ細胞ではないが、そのインスリン遺伝子のノックダウンにより、オランザピンが惹起する小胞体ストレスおよびアポトーシスが抑制されることがわかった。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

オランザピンが小胞体ストレス応答経路の一つであるPERK経路のシグナル伝達、特にインスリンの翻訳抑制を阻害することで、すい臓β細胞において過剰なインスリンの翻訳が持続して正常な立体構造を取れないインスリンが小胞体内に蓄積することや、本来ならゴルジ体、分泌小胞を介して細胞外に分泌されるインスリン量が減少することなどにより、すい臓β細胞に異常な負荷がかかり、当初は微弱であったオランザピンによる小胞体ストレスが亢進された結果、すい臓β細胞にアポトーシスが引き起こされることによって、すい臓β細胞数が減少し、1型糖尿病様の病態を提示するのではないかと推測された。このオランザピンによるPERK経路のシグナル伝達阻害が引き起こすアポトーシスの作用機序の解明は、オランザピン惹起型糖尿病発症を軽減または抑制する可能性を開くことにつながり、また、従来オランザピンの投与は禁忌または忌避するべきだとされてきた糖尿病の既往歴のある患者にも、オランザピンの投与という選択肢を与えることができる。

以上のように本論文は、抗精神病薬オランザピン惹起型糖尿病発症機構を小胞体ストレス応答に基づいて解析し、重要な知見を得た。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認める。また、令和2年1月14日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

要旨公表可能日： 年 月 日以降